

## اثر ضد لیشمانیایی اسانس گیاه اسطوخودوس علیه لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

مجتبی بنیادیان<sup>۱\*</sup>، حسین حجازی<sup>۲</sup>، حمید رضا عزیزی<sup>۳</sup>، سعید حبیبیان<sup>۴</sup>، عماد سیاحی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup>گروه بهداشت، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۲</sup>گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ <sup>۳</sup>گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۴</sup>گروه فارماکولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۵</sup>گروه دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۱۴

### چکیده:

**زمینه و هدف:** با افزایش ایجاد مقاومت دارویی در درمان بیماری ها به ویژه بیماری های انگلی، همچنین وجود عوارض جانبی ترکیبات شیمیایی، استفاده از داروهای گیاهی در درمان بیماری های انگلی در سرتاسر جهان به شدت افزایش یافته است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضد لیشمانیایی اسانس گیاه اسطوخودوس (*Lavendula officinalis*) و مقایسه آن با داروی گلوکانتیم انجام شده است.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی ابتدا اسانس روغنی از گیاه تازه خشک و پودر شده به روش تقطیر با بخار آب تهیه شده و سپس غلظت های ۰/۵، ۱/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد از اسانس و غلظت ۳۳/۸ درصد از داروی گلوکانتیم بطور جداگانه به محیط کشت دارای ۱۰۶ پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور در هر میلی لیتر اضافه شد. تعداد انگل های زنده پس از اضافه کردن اسانس و دارو در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به وسیله رنگ تریپان بلو ۱۰٪ و با استفاده از لام ثوبار شمارش شدند.

**یافته ها:** نتایج نشان داد که سرعت تکثیر پروماستیگوت ها پس از افزودن اسانس گیاه به میزان قابل توجهی نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). در غلظت های ۱۰ درصد و بیشتر اثر کشندگی نیز مشاهده شد، به طوری که در زمان ۷۲ ساعت هیچ انگل زنده ای در گروه های مذکور مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه بیانگر اثر ممانعت کننده رشد و کشندگی اسانس گیاه اسطوخودوس در شرایط آزمایشگاهی بر روی شکل پروماستیگوت لیشمانیا ماژور می باشد؛ بنابراین پیشنهاد می شود، مطالعات بیشتر برای پی بردن به اثر ضد لیشمانیایی گیاه اسطوخودوس بر روی شکل آماستیگوت انگل صورت گیرد.

**واژه های کلیدی:** اسانس، گیاه اسطوخودوس، لیشمانیا ماژور.

### مقدمه:

حاضر بیش از ۲۰ میلیون نفر در ۸۸ کشور جهان می باشد و تخمین زده می شود که ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر آلودگی به انواع لیشمانیا باشند و سالانه ۱ تا ۲ میلیون مورد ابتلای جدید رخ دهد (۳، ۴). در ایران سالانه حدود پانزده هزار نفر به سالک مبتلا می شوند که بر اساس تحقیقات موجود، میزان واقعی موارد آن ۴ تا ۵ برابر تعداد گزارش شده است (۵). این در حالی است که درمان این بیماری هنوز بر پایه ی درمان های قدیمی با پتانسیل ایجاد سمیت های سیستمیک، استوار است.

لیشمانیوز نوعی بیماری عفونی مشترک بین انسان و حیوان است که توسط گونه های مختلف جنس لیشمانیا ایجاد می شود. عوامل ایجاد کننده لیشمانیوز پوستی از خانواده لیشمانیا تروپیکا می باشند که توسط گونه های مختلف پشه خاکی جنس فلوپوتوموس منتقل می شوند (۱). لیشمانیوز پوستی هم اکنون به عنوان یک مشکل سلامت عمومی مطرح است که درمان های استاندارد و رایج آن بهبودی کامل و موثر به دنبال نداشته است (۲). تعداد مبتلایان به لیشمانیوز در حال

داروهای رایج برای درمان سالک (مانند گلوکانتیم)، پامدهای شدیدی دارند و در ۲۵-۱۰٪ موارد احتمال بازگشت بیماری وجود دارد. داروهای پنج ظرفیتی آنتیموان به عنوان اولین قدم در درمان لیشمانیوز در مناطق اندمیک به همراه آمفوتریسین B و پنتامیدین (Pentamidine)، استفاده می شود (۶). در مطالعه ای در سال ۲۰۰۶ نشان داده شد که داروهای رایج برای درمان انواع لیشمانیوز از جمله ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان، گلوکانتیم و پنتوستام در ۱۰ تا ۲۵٪ موارد، بازگشت بیماری و عدم موفقیت را نشان می دهند (۷)؛ همچنین در سال ۲۰۰۲ اثرات سمی شدید داروهای شیمیایی ضد لیشمانیوز بر روی قلب، کبد و کلیه مشخص شد (۸). از طرفی روند ایجاد مقاومت به داروهای فعلی در حال افزایش است.

از این رو، توجه بسیاری از پژوهشگران به یافتن داروهای جدید ارزان تر، ایمن تر و با عارضه ی کمتر معطوف شده است. ترکیبات طبیعی استخراج شده از گیاهان منابع خوبی برای دستیابی به داروهای جدیدتر می باشند (۹). امیتین (Emetine)، یکی از داروهای است که از ریشه گیاه ایپکا (Ipeca) بدست می آید و به صورت زیرپوستی در درمان سالک بکار می رود (۱۰، ۱۱).

طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)، در حال حاضر حدود ۸۰٪ از جمعیت جهان از داروهای گیاهی در درمان استفاده می کنند. فرآورده های طبیعی حاصل از گیاهان دارویی یک منبع گسترده تهیه ی داروها و پایه ی اصلی توسعه ی ترکیبات دارویی جدید می باشند. مطالعات متعددی در زمینه اثربخشی عصاره های گیاهان دارویی روی سالک انجام شده است (۱۲، ۱۳).

اسانس روغنی اسطوخودوس که از تقطیر گل و سر شاخه های گلدار این گیاه بدست می آید، مایعی است زرد رنگ یا زرد مایل به سبز که دارای بوی دلنشینی می باشد، به صورت سنتی قرن ها از جوشانده و چکیده این گیاه برای درمان امراض مختلف استفاده شده است. تاکنون بیشتر تحقیقات بر روی فعالیت های ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس روغنی اسطوخودوس

متمرکز بوده است؛ اما باید به این نکته توجه داشت که یکی از اجزای اصلی ترکیب اسانس روغنی اسطوخودوس، لینالول (Linalool) می باشد که دارای ویژگی ضد کته، شته و سوسک های دانه خوار بوده (۱۶-۱۴) و ویژگی های ضد تک یاخته ای آن کمتر مورد توجه قرار گرفته است. یافته های گزارش نشده پیشین مدعی است که این اسانس روغنی دارای قدرت ضد تک یاخته ای بالایی است؛ اگرچه باید تحقیقات بیشتری صورت پذیرد (۱۷). نتایج مثبت مطالعات در بررسی اثربخشی اسانس روغنی اسطوخودوس بر تک یاخته های تاژک دار شامل *تریکوموناس واژینالیس* (*Trichomonas vaginalis*)، *ژیاردیا دئودنالیس* (*Giardia duodenalis*)، *هگزامیتا اینفلاته* (*Hexamita inflata*)، در شرایط آزمایشگاهی و از طرف دیگر نتایج مثبت و قابل توجه بر روی اثربخشی اسانس روغنی غنی از لینالول اقاچیا (*Croton cajucara*)، علیه لیشمانیا آمازوننسیس (*Leishmania amazonensis*) به اثبات رسیده است (۱۷، ۱۸).

اثر عصاره گونه ای از گیاه اسطوخودوس (*L. viridis*) بر روی لیشمانیا اینفنتوم مورد بررسی قرار گرفته و تأثیر ضد لیشمانیایی این عصاره ضعیف گزارش شده است (۱۹). در مطالعه دیگر اثر عصاره ۱۰ گیاه مختلف را بر روی لیشمانیا اینفنتوم و لیشمانیا مائور مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که بیشترین تأثیر ضد لیشمانیایی مربوط به عصاره گیاه آویشن می باشد (۲۰). با توجه به اینکه لینالول از ترکیبات اصلی اسانس گیاه اسطوخودوس است؛ لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضد لیشمانیایی اسانس گیاه اسطوخودوس و مقایسه آن با داروی گلوکانتیم انجام شده است.

### روش بررسی:

این مطالعه در قالب یک مطالعه تجربی در محیط کشت آزمایشگاهی انجام شد. برای تهیه اسانس گیاه مقدار ۵/۰ کیلوگرم از سرشاخه های گلدار و تازه چین اسطوخودوس (*Lavendula officinalis*) محصول خرداد ماه و تیر ماه همان سال به صورت

خشک شده از موسسه تحقیقاتی گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی واقع در کرج خریداری شده، پودر شده و با دستگاه کلونجر مطابق با دارونامه بریتانیا، اسانس روغنی آن استحصال گردید.

حدود ۴ میلی لیتر اسانس روغنی اسطوخودوس به رنگ زرد کم رنگ و با عطر ویژه‌ی آن بدست آمد. ترکیبات و مشخصات اسانس روغنی اسطوخودوس به کمک دستگاه GC-MS Gas Chromatography (ساخت آمریکا) انجام شد. بررسی طیف جرمی به کمک نرم افزار Wiley ۲۷۵ دستگاه MS انجام شد. جهت کشت انگل از محیط‌های کشت مختلفی استفاده می‌شود؛ ولی محیط کشت N.N.N Novy- mac Neal- Nicolle از سایر محیط‌های دیگر کاربردی‌تر می‌باشد؛ همچنین از محیط RPMI 1640 نیز استفاده شد، این محیط بر روی محیط N.N.N که قبلاً ساخته شده بود، ریخته و به صورت یک محیط کشت دوفازی استفاده شد (۱۸). تعداد انگل تلقیح شده در این مطالعه  $1 \times 10^6$  بوده و انگل‌ها هنگام افزودن به محیط کشت بوسیله لام هموسیستم مورد شمارش قرار گرفتند و میزان انگل در هر میلی لیتر بدست آمد.

پس از کشت انگل محیط‌های کشت به طور مرتب، یک روز در میان از نظر وجود یا عدم وجود پروماستیگوت، تعداد و حرکت آن‌ها و آلودگی‌های ثانویه باکتریایی و قارچی مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت وجود انگل‌های کافی و با حرکت مناسب، به محیط (Brain Heart Infusion Agar = BHI) افزوده و بسته به وضعیت انگل‌ها، یک تا دو روز بعد روی محیط N.N.N جدیدی پاشاژ داده می‌شد.

به منظور حل کردن اسانس روغنی در محیط کشت RPMI 1640، از دی متیل سولفوکساید (DMSO) استفاده شد. غلظت موثر این ترکیب برای محلول کردن اسانس روغنی اسطوخودوس در محیط RPMI 1640 با روش آزمون و خطا در محیط کشت، ۵٪ تعیین شد.

پس از شمارش انگل و مشخص شدن حجم حاوی یک میلیون انگل زنده، گروه‌های مختلف تیمار

در نظر گرفته و اسانس روغنی در نسبت‌های ۰/۵٪، ۱/۵٪، ۵٪، ۱۰٪، ۱۵٪ و ۲۰٪ که به ترتیب معادل ۵، ۱۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در حجم یک میلی لیتر بود، استفاده شد (۱۱). سایر گروه‌ها شامل یک گروه شاهد حاوی انگل (۱۰۶) و محیط کشت، گروه کنترل دارو حاوی ۳۳/۸٪ گلوکانتیم و ۱۰۶ انگل و محیط کشت و همینطور یک گروه حاوی ۵٪ DMSO، انگل (۱۰۶) و محیط کشت بودند. گروه‌های مختلف در دمای ۲۶ درجه درون گرم‌خانه و در شرایط یکسان نگهداری شدند. تمامی مراحل انجام آزمایش به صورت استریل و زیر هود انجام گرفت.

در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ انگل‌های زنده با استفاده از لام هموسیستم شمارش شد. جهت رنگ کردن انگل از تریپان بلو ۱۰٪ (Trypan blue)، استفاده شد. در این روش انگل‌های زنده رنگ شده در صورتی که انگل‌های مرده رنگ را به خود نمی‌گیرند. آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام و داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS توسط آزمون تحلیل واریانس یکطرفه (ANOVA)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

### یافته‌ها:

نتیجه به دست آمده از تحلیل داده‌ها به روش ANOVA نشان داد که پس از گذشت ۲۴ ساعت از افزودن اسانس و داروی شیمیایی، غلظت ۱۰٪، ۱۵٪ و ۲۰٪ از اسانس روغنی اسطوخودوس از نظر کاهش رشد انگل در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی داری داشتند ( $P < 0/05$ ). بطوری که در دو غلظت آخر تعداد انگل‌های زنده در ساعت ۲۴ نزدیک به صفر بود. در غلظت‌های ۰/۵٪ و ۱/۵٪ اختلاف معنی داری با گروه شاهد مشاهده نشد. گروه گلوکانتیم در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی داری در تعداد انگل‌های زنده از خود نشان داد؛ حال آنکه گروه دی‌متیل سولفوکساید بدون اختلاف معنی داری با گروه شاهد ( $P > 0/05$ )، با گروه‌های حاوی غلظت‌های ۵٪، ۱۰٪، ۱۵٪ و ۲۰٪ از اسانس روغنی

اسطوخودوس و گلوکانتیم اختلاف معنی داری داشت ( $P < 0/05$ ، جدول و نمودار شماره ۱).

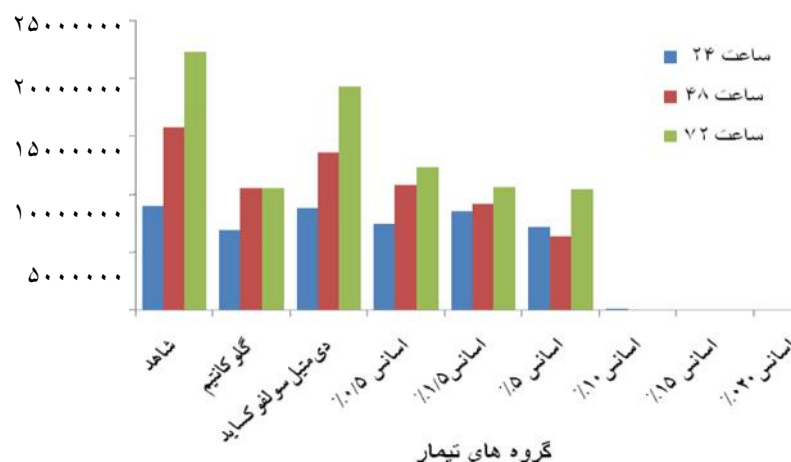
در زمان ۴۸ ساعت کاهش معنی دار تعداد انگل در غلظت ۵٪ نسبت به گروه شاهد و دی متیل سولفواکساید مشاهده شد ( $P < 0/05$ )؛ همچنین در این زمان گروه ۱۵٪ نیز نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی داری داشت ( $P < 0/05$ ). در این ساعت تعداد انگل های زنده در گروه ۱۰٪ دچار کاهش شده؛ ولی به صفر نرسید. در حالی که در گروه های ۱۵٪ و ۲۰٪ انگل زنده ای مشاهده نشد (جدول و نمودار شماره ۱).

در زمان ۷۲ ساعت گروه های دریافت کننده ی اسانس روغنی اسطوخودوس با غلظت های ۵٪، ۱۰٪، ۱۵٪ و ۲۰٪ و همچنین گروه گلوکانتیم در مقایسه با گروه شاهد و دی متیل سولفواکساید تفاوت معنی داری نشان دادند ( $P < 0/05$ )؛ همچنین تیمار ۵٪ نسبت به سایر گروه های تیمار و گروه گلوکانتیم دارای اختلاف معنی دار بود؛ در حالی که گروه های ۱۵٪ و ۵٪ نسبت به گروه گلوکانتیم و نسبت به هم اختلاف معنی داری نداشتند ( $P > 0/05$ ). در گروه های ۱۰٪، ۱۵٪ و ۲۰٪ انگل زنده ای مشاهده نشد (جدول و نمودار شماره ۱).

**جدول شماره ۱: مقایسه میانگین تعداد انگل زنده (لیشمانیا) در گروه های تیمار در زمان های مختلف**

گروه ها	زمان (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲
شاهد		$9 \times 10^7 \pm 2/5 \times 10^5 a$	$1/6 \times 10^7 \pm 1/6 \times 10^6 a$	$2/3 \times 10^7 \pm 1/6 \times 10^5 a$
گلوکانتیم		$6/9 \times 10^7 \pm 6/3 \times 10^5 b$	$10^7 \pm 5 \times 10^5 b$	$10^7 \pm 2/1 \times 10^5 b$
دی متیل سولفواکساید		$8/8 \times 10^7 \pm 5 \times 10^4 a$	$4 \times 10^7 \pm 3/8 \times 10^5 a$	$1/9 \times 10^7 \pm 3/2 \times 10^5 a$
	۰/۵٪	$7/5 \times 10^7 \pm 6/4 \times 10^5 a$	$1/1 \times 10^7 \pm 5 \times 10^5 a$	$1/2 \times 10^7 \pm 3/2 \times 10^5 b$
اسانس اسطوخودوس	۱/۵٪	$8/5 \times 10^7 \pm 2 \times 10^5 a$	$9/2 \times 10^7 \pm 5 \times 10^5 b$	$10^7 \pm 5/4 \times 10^5 b$
	۵٪	$7/1 \times 10^7 \pm 9/3 \times 10^5 b$	$6/3 \times 10^7 \pm 4/8 \times 10^5 b$	$10^7 \pm 4/8 \times 10^5 b$

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار است. ( $P < 0/05$ )، داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار می باشد.



**نمودار شماره ۱: مقایسه تعداد انگل های زنده (لیشمانیا) در گروه های دریافت کننده ی اسانس روغنی اسطوخودوس و کنترل در زمان های مختلف.**

## بحث:

اسانس‌ها، عصاره‌ها و سایر ترکیبات برگرفته از گیاهان یک منبع با ارزش برای یافتن داروهای ضد سالک هستند درمان‌های سنتی لیثمانیوز پوستی در قسمت‌های مختلف ایران به صورت یک امر عادی انجام می‌شده است. اسطوخودوس که گیاهی از خانواده نعنائیان است بر طبق باور سنتی دارای ویژگی‌های ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد نفخ، شل‌کننده عضلات صاف، آرام‌بخش و ضد افسردگی بوده و بر جراحات ناشی از سوختگی و گزش حشرات مؤثر است (۲۱). تأثیر بهبود زخم حاصل از اپی‌زیاتومی با استفاده از عصاره گیاه اسطوخودوس توسط وکیلپان و همکاران گزارش شده است (۲۲). ترکیبات اصلی اسانس روغنی اسطوخودوس عبارتند از لینالول (Linalool)، استات لینالیل (Linalyl acetate)، ۱ و ۸-سینئول (1,8-cineole)، بتا اوسیمین (Beta-ocimen)، ترپین-۴-ول (Terpinen-4-ol) و کامفور (Camphor)؛ البته هر یک از این ترکیبات می‌تواند به طور قابل توجهی در روغن‌های بدست آمده از مزارع مختلف دستخوش تغییرات شود (۲۳). در این مطالعه پروفایل اسانس روغنی به دست آمده، بر خلاف پروفایل جهانی دارای کامفور به مقدار ۴۰٪، لینالول به مقدار ۷/۶٪، برنئول به مقدار ۶/۴۲٪ و بتا یودسمول به مقدار ۳٪ بود، در عین حال فاقد استات لینالیل و دارای مقادیر جزئی ۱ و ۸-سینئول می‌باشد. از عوامل مسبب این تفاوت‌ها در ترکیبات و همچنین مقادیر اجزاء می‌توان به ژنتیک گیاه و عوامل بیرونی اشاره کرد. عوامل بیرونی مانند دمای محیط، رطوبت، نور، موقعیت جغرافیایی مانند ارتفاع، خاک (نوع خاک، شوری، PH و املاح موجود در آن) اهمیت دارند.

در بررسی حاضر غلظت‌های مختلف (۰/۵٪، ۱/۵٪، ۵٪، ۱۰٪، ۱۵٪ و ۲۰٪) اسانس روغنی اسطوخودوس با شکل پروماستیگوت لیثمانیا مائور در محیط آزمایشگاه مجاور شده و آثار ضد لیثمانیایی این اسانس در گروه‌های مختلف درمانی نشان داده شد.

میانگین تعداد انگل‌های زنده پس از افزودن ترکیبات مختلف به محیط کشت انگل لیثمانیا یکی از مهم‌ترین پارامترهایی است که در توان انگل‌کشی این ترکیبات مورد استفاده قرار می‌گیرد. روند افزایشی تعداد انگل‌های زنده در طول زمان به علت محیط بسیار غنی N.N.N در زیر محیط RPMI 1640 بوده که انگل‌ها در آن به سرعت تکثیر کرده و به محیط RPMI 1640 آزاد می‌شدند. با این حال با گذشت زمان اثربخشی گروه‌های حاوی اسانس گیاهی حفظ شده و همچنان با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داده است. در ساعت ۴۸ غلظت ۱/۵٪ (که در ساعت ۲۴ اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداده بود) دارای اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد شده و در ساعت ۷۲ گروه ۰/۵٪ نیز با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در تعداد انگل زنده پیدا کرده‌اند که می‌تواند بیانگر وجود یک سازوکار اثر طولانی مدت روی انگل‌ها باشد. این نتایج با یافته‌های قبلی که اثر اسانس گونه *L. viridis* را بر روی لیثمانیا اینفنتوم ضعیف ارزیابی کرده، متفاوت می‌باشد (۱۹).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۶ آثار ضد انگلی اسانس روغنی اسطوخودوس بر روی تریکوموناس واژینالیس، هگزامیتا انفلاته و ژیا ردیا دئودنالیس قابل توجه و معنی‌دار گزارش شده است. نتایج بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که سازوکار عمل اسانس احتمالاً تجزیه سلول‌های انگل باشد، بهرحال، مطالعات بیشتری برای مشخص کردن سازوکار دقیق آن نیاز است (۱۷)؛ همچنین در مطالعه دیگر در سال ۱۳۸۸، اثر اسانس روغنی گیاه اسطوخودوس بر تریکوموناس واژینالیس تأیید گردید (۲۴). از آنجایی که تک‌یاخته‌های تریکوموناس واژینالیس و ژیا ردیا دئودنالیس به همراه لیثمانیا جزء خانواده تاژکداران هستند، آثار ضد تک‌یاخته‌ای اسانس روغنی اسطوخودوس، بر شکل پروماستیگوت لیثمانیا مائور نیز در این تحقیق نشان داده شد. از طرفی آثار اسانس روغنی اسطوخودوس بر

سیستم ایمنی بررسی شده و نتایج آن، اثر تنظیمی ایمنی عصاره گیاه اسطوخودوس را با تحریک تکثیر لنفوسیتی در غلظت‌های کمتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کاهش تولید سیتوکین آماسی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده است (۲۵). بیشتر گزارش‌های منتشر شده سازوکار عمل اسانس‌ها را توضیح نداده‌اند گرچه مطالعات محدودی وجود دارد که سازوکار احتمالی عملکرد اسانس‌های روغنی را تداخل در مسیرهای بیوشیمیایی عنوان کرده‌اند (۲۶).

بیشتر مطالعات انجام شده به منظور یافتن گیاهان دارای فعالیت ضد لیشمانیایی بر روی شکل پروماستیگوت آن انجام شده است. از آنجایی که پروماستیگوت شکل عفونت‌زای انگل در مهره‌داران نیست، تنها ارزش مطالعات انجام شده بر روی شکل پروماستیگوت مشخص کردن فعالیت لیشمانیاکشی احتمالی ترکیبات آزمایش شده است. در نتیجه ارزیابی مقدماتی با استفاده از پروماستیگوت‌ها باید با انجام آزمایشات بر روی شکل آماسیتیگوت داخل ماکروفاژی تکمیل شود. نتایج این بررسی در شرایط آزمایشگاهی و در محیط کشت بیانگر وجود آثار ضد لیشمانیایی بوده و بنابراین ممکن است که در موجود زنده نیز تأثیرات مشابهی را از خود نشان بدهد (۲۷). در مطالعه‌ای تأثیر عصاره سیر در درمان زخم لیشمانیایی نشان داد که این عصاره پس از ۳۰ روز باعث کاهش قطر زخم می‌شود (۲۸).

نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که غلظت‌های بالاتر از ۱۰٪ اسانس روغنی استفاده شده دارای اثرات لیشمانیاکشی بالقوه‌ای است چرا که پس از افزودن این اسانس‌ها به محیط کشت انگل زنده‌ای مشاهده نشد. این نتایج با مشاهدات به دست آمده پس از افزودن اسانس گیاه فلوس که در غلظت‌های ۱، ۲ تا ۹٪ آن در محیط کشت موجب از بین رفتن تمامی پروماستیگوت‌ها شده و در غلظت‌های هزارم از این اسانس باعث کاهش تعداد پروماستیگوت‌ها

شده بود قابل مقایسه است؛ البته در مطالعه انجام شده با استفاده از اسانس گیاه فلوس، در غلظت‌های ۰/۳ تا ۰/۹ هم هیچ انگلی مشاهده نشد که می‌تواند موثرتر بودن آن اسانس را پیش‌گویی کند. هرچند نیازمند مطالعات مقایسه‌ای بیشتری در شرایط یکسان است؛ همچنین نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر با نتایج حاصل از بررسی عصاره گیاه آرتمیزیین بر شکل پروماستیگوت لیشمانیا مازور قابل مقایسه است چرا که در آن مطالعه نیز در غلظت‌های ۱۰٪ و بالاتر هیچ گونه انگل زنده‌ای مشاهده نشده است (۲۹). در ارتباط با سایر گیاهان و اثر عصاره آن‌ها روی انگل لیشمانیا مطالعات متعددی صورت گرفته است برای مثال Ahmad و همکاران تأثیر عصاره ۱۰ گیاه را روی شکل پروماستیگوت انگل مورد بررسی قرار داده و بیشترین تأثیر را مربوط به عصاره گیاه آویشن بیان نموده است (۲۰).

در مطالعه دیگری اثر عصاره الکلی و آبی گل همیشه بهار (*Calandula officinalis*) روی شکل پروماستیگوت لیشمانیا مازور مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که مقادیر ۱۷۰ و ۲۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر این عصاره‌ها موجب کاهش رشد پروماستیگوت انگل می‌شود (۳۰).

### نتیجه‌گیری:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره روغنی گیاه اسطوخودوس بر روی شکل پروماستیگوت لیشمانیا اثر انگل‌کشی داشته و با توجه به مزیت‌های فراآورده‌های گیاهان دارویی نسبت به انواع شیمیایی آن‌ها، پیشنهاد می‌شود که در ادامه این پژوهش اثر اسانس روغنی اسطوخودوس بر روی شکل آماسیتیگوت داخل ماکروفاژ نیز بررسی و در صورت اثبات اثر آن بر این شکل انگل تحقیقات در بدن موجود زنده ادامه یابد.

### تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق به ما یاری رساندند تقدیر و تشکر می‌گردد.

## منابع:

1. Hepburn NC. Management of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2001; 14(2): 151-4.
2. Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2003; 16(5): 397-401.
3. Tracy JW, Webster LT. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. The pharmacological basis of therapeutics, 9th ed. New York: McGraw-Hill Book Co; 1996: 987-1008.
4. WHO. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Available from: [www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/urden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/urden_magnitude/en/index.html).
5. Ghalib HW, Eltoun EA, Kroon CC, el Hassan AM. Identification of Leishmania from mucosal leishmaniasis by recombinant DNA probes. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992; 86(2): 158-60.
6. Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, et al. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. J Med Microbiol. 2007; 56(9): 1213-8.
7. Saldanha AC, Romero GA, Merchan-Hamann E, Magalhães AV, Macedo Vde O. Comparative study between sodium stibogluconate BP 88R and meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis treatment: I. Efficacy and safety. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32(4): 333-7.
8. Khan MA, Maruno M, Khaskhely NM, Ramzi ST, Hosokawa A, Uezato H, et al. Inhibition of intracellular proliferation of Leishmania parasites in vitro and suppression of skin lesion development in BALB/c mice by a novel lipid A analog (ONO-4007). Am J Trop Med Hyg. 2002; 67(2): 184-90.
9. Napolitano HB, Silva M, Ellena J, Rodrigues BD, Almeida AL, Vieira PC, et al. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. Braz J Med Biol Res. 2004; 37(12): 1847-52.
10. Ayatollahi J. Cutaneous leishmaniasis. J Yazd Uni Med Sci. 2005; 12: 96-104.
11. Mohebbi M, Tavana A, Javadian A, Esfahani A, Hajaran H, Akhondi B. Preparation of standard leishman inoculum and its evaluation for leishmaniasis in animal lab model. Hakim J. 2003; 6: 15-20.
12. Cavanagh HM, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. Phytother Res. 2002; 16(4): 301-8.
13. Hori M. Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a screen house. J Chem Eco. 1998; 24(9): 1425-32.
14. Ignatowicz S. Powdered herbs of the mint family (Lamiaceae) as insect repellents for protection of stored wheat grain. Polskie Pismo Entomol. 1997; 66(1/2): 135-49.
15. Jager W, Buchbauer G, Jirovetz L, Fritzer M. Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil. J Soc Cosmet Chem. 1992; 43(1): 49-54.
16. Perrucci S, Macchioni G, Cioni P, Flamini G, Morelli I, Taccini F. The activity of volatile compounds from *Lavandula angustifolia* against *Psoroptes cuniculi*. Phytother Res. 1996; 10(1): 5-8.
17. Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. Parasitol Res. 2006; 99(6): 722-8.
18. Do Socorro SRMS, Mendonca-Filho RR, Bizzo HR, de Almeida Rodrigues I, Soares RM, Souto-Padron T, et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(6): 1895-901.

19. Machado M, Santoro G, Sousa M, Salgueiro L, Cavaleiro C. Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. Flavour Fragr J. 2010; 25(3): 156-60.
20. Ahmed SB, Sghaier RM, Guesmi F, Kaabi B, Mejri M, Attia H, et al. Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia). Nat Prod Res. 2011; 25(12): 1195-201.
21. Gattefosse R. Gattefosse's aromatherapy. 2nd ed. UK: Random House; 2004.
22. Vakilian K, Attarha M, Bekhradi R, Ghebleh F, Hatami Z, Seraj A. The effect of lavender in care of postpartum episiotomy wounds. J Shahrekord Univ Med Sci. 2008; 10 (3): 63-9.
23. Jaymandi K, Rezaii M. Steam distillation apparatus and methods. 1st ed. Iran: Med plant Asso Press; 2006.
24. Ezatpour B, Badparva E, Ahmadi S, Rashidipour M, Ziaei H. Investigation of anti trichomonas vaginalis activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in invitro media. Sci J Ilam Med Univ. 2010; 16 (4): 1-6.
25. Azadmehr A, Hajiaghahi R, Rezazadeh SH. Effect of Lavender on lymphocytic growth and alfa tumor necrotizing factor. J Med Plants. 2011; 10(4): 142-7.
26. Chan-Bacab MJ, Pena-Rodriguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat Prod Rep. 2001; 18(6): 674-88.
27. Shariatifar N, Chamanzari H, Ghaemimotlagh S. Effects of Flous plant on promastigot of leishmania in culture medium. Ofogh-e-Danesh. 2005; 4(1): 5-9.
28. Ahmadi K, Mahmoud zade A, Cheraghali A, Esfahani A. Effect of Garlic extract on cutaneous leishmaniasis and the role of Nitric Oxide. J Shahrekord Univ Med Sci. 2002; 4(2): 1-7.
29. Layeghi S. Effects of *A. ciberi* and *P. rouseum* oils on *L. major* promastigot [DVM thesis]. Shahrekord Univ; 2010.
30. Masebi N, Ghafarifar F, Bahrami A. Leishmaniocidal activity of *Calandula officinalis* extracts on *Leishmania major* promastigot. J Illam Univ Med Sci. 2010; 3(2): 28-34.



## Antileishmania activity of *Levandula officinalis* essence against *Leishmania major* in in vitro media

Bonyadian M<sup>1\*</sup>, Hejazi H<sup>2</sup>, Azizi HR<sup>3</sup>, Habibian S<sup>4</sup>, Sayahi A<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Health Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>2</sup>Parasitology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; <sup>3</sup> Pathology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>4</sup>Pharmacology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran;

<sup>5</sup>Veterinary Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 7/Apr/2014 Accepted: 6/Oct/2014

**Background and aims:** Recently with the increase of drug resistance in curing diseases, especially parasitic diseases, and also due to the side effects of chemical compositions, the use of herbal drugs in curing parasitic diseases has increased significantly throughout the world. The present study was designed and performed to investigate the antileishmania effects of *Levandula* essence and to compare it with glucantime.

**Methods:** In this experimental study, first the essential oil was extracted from the fresh dried and powdered plant by steam distillation method. Then, essentials with the concentration of 0.5, 1.5, 5, 10, 15 and 20 percent and glucantime with the concentration of 33.8% were added to *Leishmania major* culture media, separately. The media contained  $1 \times 10^6$  promastigotes of parasite per milliliter. The number of alive parasites, after adding the essential and the drug at the times of 24, 48, 72 hours, were counted by the 10% trypan blue vital staining and the use of Neubauer lam.

**Results:** The results showed that the proliferation rate of promastigotes after adding the plant essential declined significantly compared to the control group ( $P < 0.05$ ). In concentration of 10% or more, the leishmanicidal effect was also observed in a way that in hour 72 no viable parasite was observed in the mentioned groups. Also, in concentration of 0.5, 1.5 and 5%, a significant difference was observed in the number of viable parasites compared to the chemical drug group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** This study indicates that *Levandula* essential has inhibitory and lethal effects on the promastigotes form of *Leishmania major* in in vitro. Therefore, this is suggested that more studies is conducted in order to identify the antileishmaniosis of *Levandula* on the amastigote form of parasite.

**Keywords:** Essence, *Levandula* plant, *Leishmania major*.

**Cite this article as:** Bonyadian M, Hejazi H, Azizi HR, Habibian S, Sayahi A. Antileishmania activity of *Levandula officinalis* essential oils against *Leishmania major* in in vitro media. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(3): 93-101.

**\*Corresponding author:**

Health Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran, Tel: 009893834424427,  
E-mail: bonyadian@vet.sku.ac.ir